

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/00111

08.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 9月 9日

REC'D 27 OCT 2000

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第255803号

WIPO

PCT

出 願 人

Applicant (s):

グンゼ株式会社  
学校法人東京女子医科大学

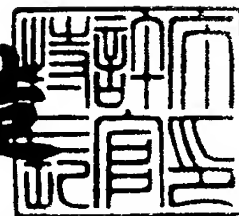
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083164

【書類名】 特許願

【整理番号】 2219JP

【提出日】 平成11年 9月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61F 2/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府綾部市井倉新町石風呂 1 番地 ゲンゼ株式会社  
研究開発部内

【氏名】 森田 真一郎

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区河田町 8 番 1 号 学校法人東京女子医科大学  
学内

【氏名】 新岡 俊治

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区河田町 8 番 1 号 学校法人東京女子医科大学  
学内

【氏名】 今井 康晴

【特許出願人】

【識別番号】 000001339

【氏名又は名称】 ゲンゼ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 591173198

【住所又は居所】 東京都新宿区河田町 8 番 1 号

【氏名又は名称】 学校法人東京女子医科大学

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706768

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】心血管系組織培養用基材および組織再生法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】生体吸収性材料からなる発泡体を生体吸収性材料からなる補強材によって強化した心血管系組織培養用基材。

【請求項 2】請求項 1 に記載の基材に細胞を播種することによって心血管系組織を再生することを特徴とする心血管系組織再生法。

【請求項 3】再生する心血管系組織が血管であることを特徴とする請求項 2 に記載の心血管系組織再生法。

【請求項 4】再生する心血管系組織が心臓弁であることを特徴とする請求項 2 に記載の心血管系組織再生法。

【請求項 5】再生する心血管系組織が心膜であることを特徴とする請求項 2 に記載の心血管系組織再生法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体吸収性高分子からなる基材の芯材として生体吸収性高分子からなる繊維状補強材を組み込むことによって得られた、組織適合性に優れた心血管系組織培養用基材、および、これを用いた人工血管、心臓弁、心膜などの心血管系組織再生方法に関する。

【0002】

【従来の技術及びその課題】

例えば、血管の分野で人工血管として最も使用されているのは非吸収性高分子を用いた血管である。例えばゴアテックス製人工血管は臨床において最も一般的に使用される。これは物性的に優れているが、非吸収性であるために移植後長期にわたって異物が体内に残存する。また小児に使用した場合、成長に伴って大きくならないため改めて手術する必要がある。

【0003】

これに対して近年Tissue Engineeringを用いた組織再生方法が試みられている

。これは生体吸収性高分子からなる足場に組織の細胞を播種し、培養することによって、自己の組織を再生しようとする試みである。すでに皮膚(M.L.Cooper,L.F.Hansbrough,R.L.Spielvogel et.al. :In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. Biomaterials, 12:243-248,1991)や軟骨(C.A.Vacanti,R.langer,et al:Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. Plast.Reconstr.Surg.,88:753-759,1991)については多くの研究例が報告されている。

【0004】

同様に血管についても自己組織から再生できれば、抗凝固剤の使用の必要がなく、また自己組織であるため成長も期待できる。

【0005】

本発明の目的は、細胞の接着性を十分に保持し、細胞増殖のための最適な足場となり、自己の組織が再生されるまでの期間、血流に対して耐性を有し、最終的には生体内に分解吸収される基材を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

心血管系組織培養用基材として、基本的に最も必要とされる条件は播いた細胞が材料にしっかりつくことと血管が再生されたときには材料が吸収されていることの2点である。この条件に最も適した材料として発泡体が考えられる。

【0007】

しかし血管で使用する場合もうひとつの条件として埋植後血管が再生するまでの期間、血流に耐えて強度を保たせなければならない。

【0008】

本発明者は、細胞の接着性に優れ、増殖のための最適な足場となる、生体吸収性材料からなる発泡体を、同じく生体吸収性材料からなる補強材で強化することにより、上記課題が達成できることを見出した。

【0009】

本発明は、下記の1.～5.を提供するものである。

1. 生体吸収性材料からなる発泡体を生体吸収性材料からなる補強材によって強化した心血管系組織培養用基材。
2. 請求項1に記載の基材に細胞を播種する事によって心血管系組織を再生することを特徴とする心血管系組織再生法。
3. 再生する心血管系組織が血管であることを特徴とする請求項2に記載の心血管系組織再生法。
4. 再生する心血管系組織が心臓弁であることを特徴とする請求項2に記載の心血管系組織再生法。
5. 再生する心血管系組織が心膜であることを特徴とする請求項2に記載の心血管系組織再生法。

【0010】

【発明の実施の形態】

生体吸収性材料としては、ポリグリコール酸、ポリ乳酸（D、L、DL）、ポリカプロラクトン、グリコール酸-乳酸（D、L、DL）共重合体、グリコール酸-カプロラクトン共重合体、乳酸（D、L、DL）-カプロラクトン共重合体、ポリ（ $\epsilon$ -ジオキサノン）等が挙げられる。

【0011】

心血管系組織としては、血管、心臓弁、心膜などが挙げられる。

【0012】

本発明の基材は、生体吸収性材料からなる発泡体を生体吸収性材料からなる補強材（繊維状、不織布状、フィルム状）によって強化する。なお、発泡体と補強材を構成する生体吸収性材料の組み合わせは任意であるが、例えば血管の場合、発泡体として乳酸-カプロラクトン共重合体、補強材として動脈の場合ポリ乳酸、静脈の場合ポリグリコール酸の組み合わせが例示できる。更に、心臓弁、心膜の場合は発泡体として乳酸-カプロラクトン共重合体、補強材としてポリ乳酸の組み合わせが例示できる。

【0013】

発泡体の孔径は細胞が適当に接着し、増殖すると同時に心血管系組織として移植した際に血液漏れしないことが好ましく、その孔径は通常1mm以下、好ましく

は5~100  $\mu$ mである。構造は心血管系組織が血管の場合には円筒形、心膜、心臓弁の場合には平面状であり、血管の場合、内径及び長さは目的とする血管に合わせて作製する。基材の厚みは吸収期間あるいは縫合のしやすさから決定され、通常5mm以下、好ましくは500  $\mu$ mから2mmである。

#### 【0014】

発泡体の作製方法としては、以下の方法が例示できる。

##### (1) 凍結乾燥法

基材とするポリマー溶液を型に入れて凍結した後、凍結乾燥する。凍結温度、ポリマーの濃度によって種々の空孔径を有する発泡体を得られる。(実施例に記載)

##### (2) 溶出法

水溶性物質を基材とするポリマー溶液に混合し、乾燥後、当該水溶性物質を水洗によって洗い流す。水溶性物質の粒子に応じた径を有する発泡体を得られる。本例においてはシュークロースが適当に使用できる。

#### 【0015】

補強材は基材となる発泡体より強度が大きい必要がある。繊維状、不織布状、フィルム状等から選択できる。

#### 【0016】

補強材は発泡体と一体になっていることが好ましく、その位置は内面、中心、外面のいずれでも可能であるが発泡体の内面は血管内皮細胞との接着に参与するため、中心あるいは外面が好ましいが、内面でも可能である。

#### 【0017】

播種する細胞としては、心血管系組織ではほぼ共通の細胞種を用いる。即ち、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞で、これらの2種または3種の混合培養細胞が例示でき、混合培養細胞を使用して、組織構築を行う。

#### 【0018】

使用する細胞の培養条件、播種方法を以下に示す。

##### A. 細胞単離、細胞培養、細胞数増大

完全清潔下に採取した血管組織を細胞培養液に浸漬し、クリーンベンチ内でリ



ン酸化生食を用いて洗浄する。次に、ペトリディッシュ上で外科メスを用いて単純なexplant technique に準じて組織の裁断を行う。約  $1-2\text{ mm}^2$  大の細組織片を均等にディッシュ上に分配し、約 20 分後、組織がディッシュ下面に強固に接着した後に培養液を加える。培養液は、Dulbecco's Modified Eagles Media (DMEM) に 10% 牛胎児血清と 1% の抗生物質溶液 (L-グルタミン  $29.2\text{ mg/ml}$ 、ペニシリン G  $1000\text{ u/ml}$ 、ストレプトマイシン硫酸塩  $10,000\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) を補填したものを使用する。血管壁細胞は、5-7 日後に、細胞が組織からディッシュ上に移動し始め、さらに 1 週間後には混合細胞コロニーがexplant組織片の周囲に形成される。その 2-3 週後に、混合細胞はディッシュ上でコンフルエントの状態を形成する。直ちに 0.25% トリプシンにて Passage を行い、 $75\text{ cm}^2$  の培養フラスコ上での培養を開始するが、概ねこのフラスコが confluent になると約二百万個の細胞を得たことになる。5%  $\text{CO}_2$ 、21%  $\text{O}_2$  の環境下で細胞培養を行い、 $1.0 \times 10^6$  個の細胞数を得るまで培養を続ける。培養液は 4-5 日ごとに交換するが、予備実験の結果では細胞の doubling time は、約 48 時間である。尚、経過中の細胞数の算定はトリパンブルーによる古典的な exclusion 法に従って行う。

#### B. 細胞隔離、内皮細胞純化

混合細胞がコンフルエントに達し、ある程度の細胞数が得られた段階で、以下の手順に従い、FACS を用いて混合細胞から内皮細胞を選別分離する。Biomedical Technologies 社の Dil-acetylated LDL (蛍光色素マーカー) (以下 Dil-Ac-LDL) を混合細胞培養液中に  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加し、24 時間の incubation を行う。このマーカーは内皮細胞、マクロファージに特有なスカベンジャー経路を通過して細胞内に取り込まれる。24 時間後に trypsinize を行い、混合細胞浮遊液を作成し、セルソーター (FACS machine: Bectin Dickenson 社製) を使用してソートする。細胞は、その大きさと蛍光発光に基づいて Dil-Ac-LDL 陽性と陰性に選別される。分離後これらを別々に培養し、内皮細胞が二百万個になるまで継続する。

#### C. 組織構築

組織を構築する第 1 段階は、in vitro における細胞播種である。具体的には、生分解性の培養基材に約  $1.00\text{ 万個}/1\text{ cm}^2$  の Dil-Ac-LDL 陰性の線維芽細胞を播

種する。

#### 【0019】

濃縮細胞浮遊液のポリマー上への播種直後は、30-60分間培養皿上でクリーンベンチ内に放置し、その後約50mlの培養液を添加する。培養液は基本的に毎日交換し、7日後、外科的移植の一日前に内皮細胞の細胞浮遊液（約二百万個）でさらなる播種を行い、この作業で単一層の内皮細胞化を図る。

#### 【0020】

上記のA.～C.は、心臓弁、心膜、血管作製の際の細胞採取、培養、播種方法を例示するものである。

#### 【0021】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明する。

##### 実施例1

##### ・血管再生用材料の作製

外径10mmのガラス製試験管にポリ-L-乳酸繊維からなる平織(写真)を円筒状にして2重にまきつけた。これを内径12mmの型枠内に設置し、間隙にL-乳酸-カプロラクトンからなる共重合体(50:50)のジオキサン溶液(5%)を流し込み、凍結後凍結乾燥した。

#### 【0022】

取り出した円筒形人工血管は基材が発泡体構造で、心材に繊維状強化材が組み込まれた構造をしていた(図1, 図2)。

##### ・細胞の培養

皮膚小切開より約5mm長の末梢静脈片を完全清潔下に採取し、直ちに組織培養液に浸漬する。単純explant法をもちいて、細胞の単離を行った。細胞培養液は上述した一般的細胞培養液のDMEM液を使用し、2-3日ごとに培養液の交換を行った。

##### ・細胞の播種

培養した細胞を作製したマトリックスに1cm<sup>2</sup>あたり約100万個の内皮細胞と線維芽細胞の混合細胞を播種し、さらに表面が細胞によって被われるまで、約1週

間培養を継続した。

【 0 0 2 3 】

【発明の効果】

動物実験

上記で作製した人工血管を子犬の下大静脈に移植したところ、破裂閉塞は認められず、術後3ヶ月目の血管造影検査でも良好な開存が認められた（血管造影写真、図3）。さらに6ヶ月後に開胸したところ、移植部位に一致して自己血管の再生が認められた。

【 0 0 2 4 】

一方ポリ-L-乳酸繊維で強化しない材料は置換後1週間後に破裂し実験動物は突然死した。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の血管培養用基材の断面を示す図面代用写真である。

【図2】本発明の血管培養用基材の平面を示す図面代用写真である。

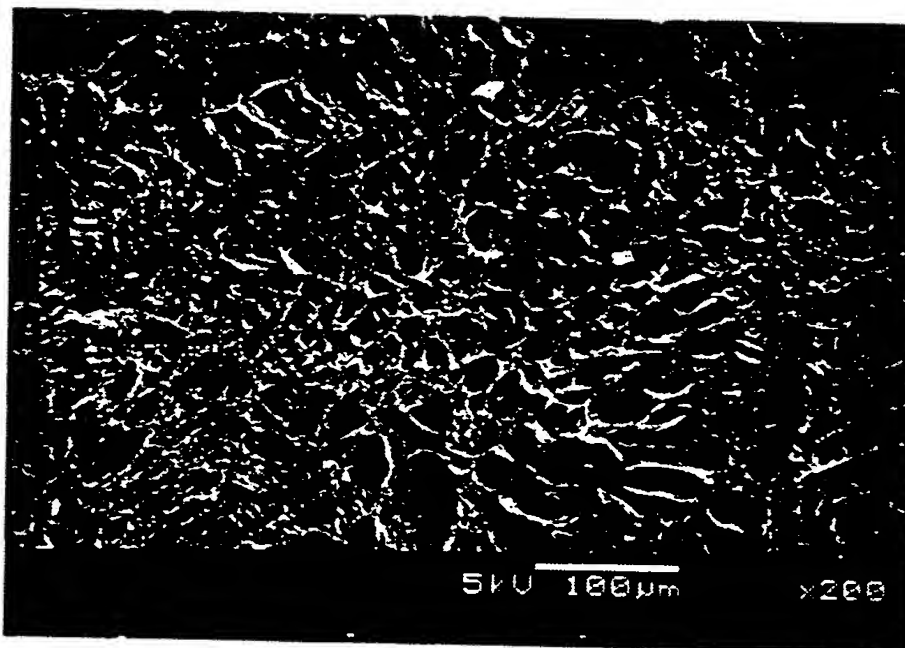
【図3】術後3ヶ月目の血管造影写真を示す図面代用写真である。

【書類名】図面

【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】細胞の接着性を十分に保持し、細胞増殖のための最適な足場となり、自己の組織が再生されるまでの期間、血流に対して耐性を有し、最終的には分解吸される基材を提供する。

【解決手段】生体吸収性材料からなる発泡体を生体吸収性材料からなる補強材によって強化した心血管系組織培養用基材。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成 11 年 特許願 第 255803 号
受付番号	59900879502
書類名	特許願
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成 11 年 9 月 13 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001339
【住所又は居所】	京都府綾部市青野町膳所 1 番地
【氏名又は名称】	グンゼ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	591173198
【住所又は居所】	東京都新宿区河田町 8-1
【氏名又は名称】	学校法人東京女子医科大学

【代理人】

申請人

【識別番号】	100065215
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜 TNKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	三枝 英二

【選任した代理人】

【識別番号】	100076510
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜 TNKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】	100086427
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜 TNKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】	100090066
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜 TNKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	中川 博司

次頁有

認定・付加情報（続き）

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜  
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜  
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜  
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜  
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 号 北浜  
T N K ビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 中野 睦子

次頁無



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001339]

1. 変更年月日	1990年 8月 8日
[変更理由]	新規登録
住 所	京都府綾部市青野町膳所1番地
氏 名	ゲンゼ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591173198]

1. 変更年月日	1991年 8月 8日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区河田町8-1
氏 名	学校法人東京女子医科大学